

CT

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-500580

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)1月19日

(51)Int.Cl.
A 61 K 38/00識別記号
A D P
8314-4CF I
A 61 K 37/02
A D P

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 11 頁)

(21)出願番号 特願平5-504766
 (86) (22)出願日 平成4年(1992)9月9日
 (85)翻訳文提出日 平成6年(1994)3月9日
 (86)国際出願番号 PCT/AU92/00480
 (87)国際公開番号 WO93/04690
 (87)国際公開日 平成5年(1993)3月18日
 (31)優先権主張番号 PK8279
 (32)優先日 1991年9月9日
 (33)優先権主張国 オーストラリア(AU)
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
 C, NL, SE), AU, CA, JP, US

(71)出願人 ベブチド テクノロジイ リミテッド
 オーストラリア国 2099 ニュー サウス
 ウエールズ ティー ホワイ インマン
 ロード 4-10
 (71)出願人 キングス カレッジ ロンドン
 イギリス国 WC2R 2LS ロンドン
 ザ ストランド (番地なし)
 (72)発明者 ミカエリス, ジューゲン
 オーストラリア国 2118 ニュー サウス
 ウエールズ カーリングフォード ホニ
 トン アヴェニュ イースト 10
 (74)代理人 弁理士 志賀 正武 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 糖尿病の合併症及び病因の処理方法

(57)【要約】

本発明は糖尿病の合併症と病因との治療のための方法を提供する。この方法は $(\beta - A_1 a - H_i s)_n$ 、 $(Lys - H_i s)_n$ 、式 $R_1 - x - R_2$ の化合物、製薬上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製薬上許容し得る媒体、ここで n は 2-5 であり、 R_1 は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファーアミノが 1 から 1-2 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってアセチル化され、 R_2 は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付隨的にアルファーカルボキシルが 1 から 1-2 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及び X は $R_3 - L$ 又は $D - H_i s (R_4) - R_5$ であり、ここで R_3 は空位か又は 1 から 1-2 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子の ω -アミノアシルであり、 R_4 は空位又はアルキルースルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び／又はアミノ基による修飾イミダゾールであり、 R_5 は空位又は 1 から 1-2 炭素原子、好適には 2 から 6 炭素原子のカルボキシ（アルキル）アミドである、よりなる群から選択された化合物

を備えた組成物の糖尿病患者への投与を包含する。好ましくはその化合物はカルノシンである。

請求の範囲

1. $(\beta-\text{A}-\text{Lys}-\text{His})_n, (\text{Lys}-\text{His})_n$ 、式 R_1-x-R_2 の化合物、製葉上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製葉上許容し得る液体、ここで n は 2-5 であり、 R_1 は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付随的にアルファーアミノが 1 から 12 塩素原子、好適には 2 から 6 塩素原子のアルキル又はアルアルキルによってアセチル化され、 R_2 は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付隨的にアルファーカルボキシルが 1 から 12 塩素原子、好適には 2 から 6 塩素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及び x は R_3-1 又は $D-\text{His} (R_4)-R_5$ であり、ここで R_3 は空位か又は 1 から 12 塩素原子、好適には 2 から 6 塩素原子の ω -アミノアシルであり、 R_4 は空位又はアルキルースルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び／又はアミノ基による導體イミダゾールであり、 R_5 は空位又は 1 から 12 塩素原子、好適には 2 から 6 塩素原子のカルボキシ（アルキル）アミドである、よりなる群から選択された化合物を備える組成物を被験者に投与することを備えた糖尿病患者における合併症と糖尿病の病因の治療方法。
2. 前記化合物がカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、D-カルノシンとカルシニンからなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の方法。
3. 前記化合物がカルノシンであることを特徴とする請求の範囲第 2 項記載の方法。
4. R_1 と R_2 が L- 又は D- リジン又は L- 又は D- アスパラギン酸又は L- 又は D- グルタミン酸又はそれらの相同物であることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の方法。
5. 前記組成物がさらにアミノグアニジンを備えることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 4 項のうちいずれか 1 項記載の方法。
6. 前記組成物がインシュリンスルホニル尿素、ビグアニジン及び／又はアミリン阻害体とともに共投与されることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 5 項のうちいずれか 1 項記載の方法。
7. 前記組成物が注射、注入、採取、吸入、点眼、イオン導入法又は局所付加

によって投与されることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 6 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

8. 前記組成物が経口的又は点頭的に投与されることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 7 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

9. 前記組成物が、その組成物が皮膚穿通、皮膚付着、組織吸収／吸着、皮膚透析及び／又は皮膚刺激に關しては改善されたような分子であるところの別な分子と混合され又は結合されたものである請求の範囲第 1 項から第 7 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

10. 前記分子が、 α -ラウリル硫酸ナトリウム、 α -ラウリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、 α -ラウリルエトキシレート、オクテノール、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、ニトログリセリン、エタノール及びそれらの組み合わせよりなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第 9 項記載の方法。

11. 前記化合物が葉原前庭体の形態中にあることを特徴とする請求の範囲第 1 項から第 10 項のうちいずれか 1 項記載の方法。

12. 糖尿病の合併症と病因の治療のための薬の開発において、 $(\beta-\text{A}-\text{Lys}-\text{His})_n, (\text{Lys}-\text{His})_n$ 、式 R_1-x-R_2 の化合物、製葉上許容し得るそれらの塩類とそれらの組み合わせ；及び製葉上許容し得る液体、ここで n は 2-5 であり、 R_1 は 1 又は 2 の自然発生アミノ酸であり、付隨的にアルファーカルボキシルが 1 から 12 塩素原子、好適には 2 から 6 塩素原子のアルキル又はアルアルキルによってエステル化又はアミド化され、及び x は R_3-L 又は $D-\text{His} (R_4)-R_5$ であり、ここで R_3 は空位か又は 1 から 12 塩素原子、好適には 2 から 6 塩素原子の ω -アミノアシルであり、 R_4 は空位又はアルキルースルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び／又はアミノ基による導體イミダゾールであり、 R_5 は空位又は 1 から 12 塩素原子、好適には 2 から 6 塩素原子のカルボキシ（アルキル）アミドである、よりなる群から選択された化合物の使用。

明細書

糖尿病の合併症及び病因の治療方法

本明は、糖尿病の合併症と病因の治療方法に関する。

ジペプチドであるカルノシンは、肉から得られる無安定性抽出物質として、約 90 年前に発見された (Gulevitsch と Amirabsibi, 1990)。以来これら初割の原物質については、ジペプチドの分布と代謝に關する多くのデータが蓄積された。カルノシン (β -アラニル- $\text{l}-\text{ヒスチジン}$)、及びアンセリン (β -アラニル- $\text{l}-\text{メチル-}\text{l}-\text{ヒスチジン}$) やホモカルノシン (γ -アミノ- $\text{D}-\text{チリル-}\text{l}-\text{ヒスチジン}$) のよう、その関連化合物は、多數の哺乳動物の骨格筋肉 (2-20 mM) 由来 (0.3-5 mM) を含む組織に、ミリモル濃度で存在している。ジペプチドのこの群の、生理学的機能を説明するための統一された仮説は存在していないが、それらの抗酸化特性、放射線障害からの DNA の保護能力、二価カチオンのキレート能、生理的 pH 値での驚異的な緩衝能力から、それらのインビボでの主要な機能が、タンパク質、糖質及び他の巨大分子を保護するものであるとの提議がなされた。

自由ラジカル拮抗剤としての機能に付け加えて、カルノシンは「免疫調節剤」として作用し (Nagai (Nagai) 特許: GB 2143732A)、それは、ある種の癌治療に有効な性質を持つことが主張されている (Nagai, 特許 DE 3424781A1)。カルノシンは、過酸化脂質に誘起された白内障の治療にも有効であることが示された (Bavizbayev, 1989)。また、カルノシンは、外傷の治療過度を促進できるという医薬もある。

非酵素的グリコシレーション(glycosylation)

自由ラジカル障害は、タンパク質及び核酸の構造に作用する唯一の過程ではない。非酵素的グリコシレーション (グリケーション(glycation)) である。食物化学におけるメイラード反応 (メイラード、1912) または褐色反応は、アミノ基とアルデヒドまたはケト基との反応を含み、それは変性アミノ基を生成し、結果グリコシレーションが進行した最終生成物 (advanced-glycosylation-end-product, AGE) となる。

13. 前記化合物がカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、D-カルノシンとカルシニンからなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項記載の使用。
14. 前記化合物がカルノシンであることを特徴とする請求の範囲第 1-3 項記載の使用。
15. R_1 と R_2 が L- 又は D- リジン又は L- 又は D- アスパラギン酸又は L- 又は D- グルタミン酸又はそれらの相同物であることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項記載の使用。
16. 前記薬がさらにアミノグアニジンを備えることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項から第 1-5 項のうちいずれか 1 項記載の使用。
17. 前記薬がインシュリンスルホニル尿素、ビグアニジン及び／又はアミリン阻害体とともに共投与されることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項から第 1-6 項のうちいずれか 1 項記載の使用。
18. 前記薬が注射、注入、採取、吸入、点眼、イオン導入法又は局所付加によって投与されることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項から第 1-7 項のうちいずれか 1 項記載の使用。
19. 前記薬が経口的又は点頭的に投与されることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項から第 1-8 項のうちいずれか 1 項記載の使用。
20. 前記化合物が、その組成物が皮膚穿通、皮膚付着、組織吸収／吸着、皮膚透析及び／又は皮膚刺激に關しては改善されたような分子であるところの別な分子と混合され又は結合されたものである請求の範囲第 1-2 項から第 1-9 項のうちいずれか 1 項記載の使用。
21. 前記分子が、 α -ラウリル硫酸ナトリウム、 α -ラウリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、 α -ラウリルエトキシレート、オクテノール、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、ニトログリセリン、エタノール及びそれらの組み合わせよりなる群から選択されたものであることを特徴とする請求の範囲第 20 項記載の使用。
22. 前記化合物が葉原前庭体の形態中にあることを特徴とする請求の範囲第 1-2 項から第 21 項のうちいずれか 1 項記載の使用。

oducts) (AGE - 生成物) を形成する。インビボでのグリケーションは遅いが、根本的に重要なのは、老いること、及び糖レベルが上昇する、即ち糖尿病という病理的状況である。

タンパク質のグリケーションは試験管の中で実施することができる。いくつかの研究により、ほとんどのタンパク質とDNAが、非酵素的グリコシレーションの潜在的ターゲットであり、そこでは、糖が分子のアミノ基に、シップ塩基を通して結合し始めるということが示された。引続きアルデヒドが起こり、着色された生成物をえる（アマドリ生成物と呼ばれる）。さらに、アマドリ生成物の遅く持続されていない反応が起こる。

タンパク質中の好みのグリケーション部位の分析により、リジン残基のアミノ基が、特にヒステジン残基に近接しているとき、主要な目標になることが示された（ShiltonとYellon, 1991）。インビボでの長い半減期を持つ安定なペプチドの探索において、カルノシンのアミノ酸配列がシトローハミヨに類似しており、糖と反応し、アルデヒド捕捉剤として反応する能力を有していることを見いたした。さらに、カルノシンは實質的に非毒性であり、よく証明された毒性試験によれば、その材料は哺乳類に5-10 g / 体重1 kg のレベルまで投与することができ、長期間の治療にわたって毒性副作用は予想されないことを示した。

その他のただ一つの化合物だけが、糖と反応し、アマドリ生成物を遮断することにより、グリケーションを還元化することが示された。アミノグアニジンは、インビボとインビトロの両方で、グルコース誘起のグリケーションが進行した最終生成物を減少させる。不幸にも求核的なヒドラジンであるアミノグアニジンは、非生理的であり、知られていない长期の毒性がある。

糖尿病

糖尿病は、インシュリンの急性または慢性欠乏に起因する代謝上の疾患である。これは、血糖グルコースレベルの上昇によって診断される。急性状態は、インシュリン依存性組織のグルコース取り込みの減少によって特徴づけられる。生体は、その結果生ずる脂肪分解の増加とグリコーゲン合成の減少によるエネルギー欠乏を中和する。糖尿病の病状が重篤であるとき、熱量は2つの主要な源から失われる。

な効果を有していると思われる。

グリケーションとアテローム性動脈硬化症

最近の研究により、AGEがアテローム性動脈硬化症の進行において機能を有しているかもしれないことが示唆されている。これは、ヒトの单球が、その表面にAGE特異性レセプターを有しており、リリーシング(releasing)シトキンによって刺激されたとき応答するという発見に基づいている。血管壁に対する小さな障害は、サブ-内皮AGEに晒し、单球の浸潤を促進し、アテローム性動脈硬化症の進行を開始する。物理しているリボタンパクもまたグリケーションを受け、それは、グリケーションされていないリボタンパクより早い速度で内皮細胞によって取り込まれる。これは、糖尿病において重要であり、グリケーションされたリボタンパクの血糖レベルの上昇が報告されている。従って、カルノシンのような抗グリケーション特性を有する化合物は、血管の疾患に積極的な効果を持つ。

糖尿病性合併症の理由は充分に理解されていないので、系統的な過血糖状態を避けるために必要なグルコース濃度の変化に応答して、皮下注射後にインシュリンを速やかに放出することは、適切ではないかもしれない。従って、糖尿病の血糖レベルは、平均して標準より高く、それはグリケーションのレベルの増加をもたらす。最もよい例は、グリコヘモグロビンであり、それは細胞グルコースレベルに比例した量が赤血球中で非酵素的に形成する。グリケーションされたヘモグロビンと血清アルブミンの割合が高いことは、糖尿病の過血糖の度合の監視に使用される。

血清中の高いグルコースレベルの長期にわたる影響を中和する化合物の、制御された食事の採取を、アミリン選択での、インシュリン投与、スルホニル尿素とビグアニド(bioguanide)処理のような制御された糖尿病治療に付け加えることは有効であろう。グリケーションに参加するのは、グルコース、ガラクトース、フルクトース、リポース及びオキシリポースのような多元糖の開鎖形態だけである。この自由アルデヒド基を捕捉し、それを非毒性形態に結合させることにより、インビボ及びインビトロでの高い糖レベルに起因する傷害を減少できるもの信じている。合併症と病理の処理のために提案された化合物は、以下の特徴のうち

ある。即ち、グルコースは一度失われ、体タンパク質もまた失われる。これは、インシュリンが促進する筋肉から導かれるアミノ酸からの新生成が不十分だからである。急性の病気は、インシュリン注射によって制御できるが、その制御は決して完全にはできないので、糖尿病の長期にわたる運命は、生前の後期に、目（白内障発生や青黒斑）、腎臓（腎臓病）、神経（神経炎）、及び血管（血管炎やアテローム性動脈硬化症(atherosclerosis)）において起こる合併症に依存する。冠状心疾患は、糖尿病及び非糖尿病も同様に、最も一般的な死因であることは充分確認されている。

尿タンパクの分析は、糖尿病患者の重大な腎臓病（腎臓病）の存在を検出するために通常要求される。尿タンパク結果が正であることは、一過性または重要でない検査結果の発見であるかもしれないし、あるいは腎臓障害の初期徵候であるかもしれない。最も重大なタンパク尿は、腎臓症候群、ハイバーテンション、及び進行している腎臓障害と関連している。これらの条件下では、肾糸球体は、タンパク質の透過性が上昇するが、その機構はあまり解明されていない。その影響は、全腎臓障害をむしろ急速に促進させ、最終的に死に至らしめるので非常に重大である。このタンパク尿の生成は、糖尿病、蛋白質沈着症、妊娠性蛋白のような疾患の二次的構造として起こる。

糖尿病の他の合併症として、網膜疾患の進行におけるグリケーションの潜在的役割を考慮に入れなければならない。網膜毛細管は、毛細管内腔を沿って並び、透達性（血清-眼液）障壁を形成する内皮細胞、及び周皮細胞（浆細胞）を含んでおり、それらは、その2つの細胞タイプにより生成される基底膜で包まれている。糖尿病性網膜疾患の初期段階において、眼周周皮細胞は選択的に失われ、基底膜を取り囲んだゴーストのような袋を放出する。血清-眼液障壁の破壊は、もうひとつのが原因である。アルドース還元酵素阻害剤が、動物の実験的網膜疾患の治療において研究されている。それらの作用の機序は、ソルビトールの蓄積と、結果としての透達性の変化を阻害することである。しかし、ハメスラ(Hamza et al.) (1991)が、アミノグアニジンが実験的糖尿病性網膜疾患の進行を阻害することを示したという事実から、非酵素的グリコシレーションとの結合が明らかになった。カルノシンのような他の潜在的なグリケーション阻害剤も積極的に

のひとつまたはそれ以上を有するペプチドである。

1) 比較的高い投与量においても非毒性であること。

2) 腎内の特異的プロテアーゼによって開裂されず、完全に血清または器官に吸収されること。しかし、腎臓によってクリアされ、それによって糖尿病のグルコースとして腎臓の組織に分布されること。

3) そのペプチドは、タンパク質表面のアミノ基に比較して、遠元端と速く反応すること。

4) 最終的にグリケーションしたペプチドは、グリケーションしたアミノ酸とは逆に、突然非活性とならないこと。

5) そのペプチドが血清または組織中の特異的プロテアーゼにより開裂したならば、結果的なアミノ酸は、糖尿病の治療価値がある、例えば新生成を促進したり腎の腎臓平衡を中和したりすること。

発明の要旨

本発明者は、カルノシンと類似の活性を持つペプチドは、糖尿病の合併症及び病因の処理に有効であると信じる。

従って、第1の発明において、本発明は、糖尿病の合併症及び病因の処理方法である。その処理方法では、糖尿病患者へ(R₁-Ala-His)_n、(Lys-His)_n、一般式R₁-X-R₂の化合物、それらの要素上昇される場合、及びそれらの組合せからなる群から選ばれる化合物と、質量上許容されるキャリアからなる組成物を投与する。ここで、nは2-5、R₁は1または2の天然発生(natural occurring)アミノ酸で、炭素数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラルキルでエステル化されたローカルボキシルを有していてよい。R₂は1または2の天然発生アミノ酸で、炭素数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアラルキルでアセチル化されたローアミノを有していてよい。また、XはR₃-1またはD-His(R₄)-R₅であって、R₃は空位または炭素数1から12、好ましくは2から6のローアミノアシルである。R₄は空位またはアルキルースルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び/またはアミノ基で導かれたイミダゾールであり、R₅は空位または炭素数1から1

2、好ましくは2から6のカルボキシル(アルキル)アミドである。

第2の選択において、本発明は、 $(\beta\text{-Ala-His})_n$ 、 $(\text{Lys-His})_n$ 、一般式 R_1-X-R_2 の化合物、それらの薬理上許容される塩、及びそれらの組合せからなる群から選ばれた化合物の、糖尿病の合併症及び病因の処理用医薬の合成における用途である。ここで、 n は2-5、 R_1 は1または2の天然発生アミノ酸で、炭素数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアルキルでエステル化された α -カルボキシルを有していてもよい。 R_2 は1または2の天然発生アミノ酸で、炭素数1から12、好ましくは2から6のアルキルまたはアルキルでアセチル化された α -カルボキシルを有していてもよい。また、 X は R_3 -lまたは $D-His(R_4)-R_5$ であって、 R_3 は空位または炭素数1から12、好ましくは2から6の ω -アミノアシルである。 R_4 は空位またはアルキルースルフィドリル、ヒドロキシル、ハロゲン及び/またはアミノ基で修飾されたイミダゾールであり、 R_5 はボイドまたは炭素数1から12、好ましくは2から6のカルボキシル(アルキル)アミドである。

本発明の好ましい実施形態では、 R_1 及び R_2 は、L-またはD-リジンあるいはL-またはD-アスパラギン酸あるいはL-またはD-グルタミン酸あるいはこれらの両同体である。本発明の好ましい実施形態では、その化合物はカルノシン、アンセリン、オフィジン、ホモカルノシン、ホモアンセリン、D-カルノシン、及びカルシンからなる群から選ばれ、最も好適には、化合物はカルノシンである。

本発明のさらに好ましい実施形態では、その組成物は、アミノグアニジンのような、糖尿病の合併症及び病理の処理に有効な効果を有する他の化合物を含む。

さらに、多くの治療されるべき患者が、インシュリンスルホニル尿素、ビグアニド、またはアミリン過剰治療を受けていてもよく、本発明の組成物は、そのインシュリンスルホニル尿素、ビグアニド、またはアミリン過剰治療と共に投与してもよい。

スルホニル尿素類ビグアニド治療についてのさらなる情報は、ベックニールセン(Beck-Nielsen)の“Pharmacology of Diabetes”, C.E.HagensenとC.Stanley編、1991, pp75-92、そこに含まれる参考文献の開示に見いだされる。

上で述べたように、その組成物は注射によって投与してもよい。例えば、無菌の注射可能な水性もしくは油性懸濁液のような注射可能な薬剤は、適宜の分散または溶解剤及び懸濁剤を使用して、当業者によく知られた方法に従って製造できる。その無菌の注射可能な薬剤は、「非毒性で非経口に許容されうる希釈剤または溶媒中の、無菌注射可能な溶液または懸濁液でもよい。使用してよい液体及び溶媒は、水、リンガル液、及び生理食塩水である。さらに、無菌の固定油(fixed oil)は、溶媒または懸濁媒体として、従来通り使用することができる。この目的のために、合成モノノジグリセリドを含む任意の種やかな固定油を用いてよい。さらに、オレイン酸のような脂肪酸は、注射可能な薬剤で使用できることがわかった。

その組成物の投与すべき日毎の全投与量は、治療されるべきホスト及び、特に投与方法に依存するだろう。ある特定の患者への特定の投与量レベルは、採用されたその特定の化合物の活性、年齢、体重、一般的健康、性、食餌、投与時間、投与経路、排泄速度、及び患者が受けける副作用の重さを含む要因の変化に依存することは理解できるであろう。必要とされる投与量レベルの選択は、この分野の熟達した者の専門的技術の範囲内であると思われる。

カルノシンの投与量は、20mgから2g/体重kg/日であり、好ましくは1000mgから2000mg/体重kg/日であろうと思われる。

上で述べたように、糖尿病に関連した合併症のひとつは白内障である。従って、本発明の組成物の投与の特に好ましい形態は、点眼である。この状況において、薬理上許容されるキャリアは、無菌の水性または非水性溶液、懸濁液、乳化液、及び軟膏である。点眼に適した薬理上許容される液体の例は、プロピレングリコール及び、薬理上許容されるアルコール、ゴマまたはピーナッツ油及び他の薬理上許容される油、石油ゼリー、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース塩、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースのような水溶性の液に許容される非毒性ポリマー、ポリアクリル酸塩、アクリル酸エチル、ポリアクリルアミドのようなアクリレート、ゼラチン、アルギメント、ベクチンのような天然物、酢酸デンブン、ヒドロキシエチルデンブンエーテル、ヒドロキシプロピルデンブンのようなデンブン誘導体、両性に、ポリビニルアルコール、ポ

糖尿病におけるアミリンプロテカーゼの使用についてのさらなる情報は、ウェスター・マークら(Westermark et al.) 1987, DNA S, 84, 3881-3885、そこに含まれる参考文献の開示に見いだされる。

インシュリン治療の大きな欠点のうちのひとつは、注射を繰り返して必要となることがある。本発明は、カルノシンと、ビグアニドまたはスルホニル尿素との経口投与による他の方法を提供でき、それは糖尿病に対してより効果的である。

本発明の組成物は、注射、注入、採取、吸入イオン透達法、または局部塗布のような実施の方法で投与することができる。しかし皮膚では、経口投与するのが好ましい。

さらに好ましい具体例では、活性化合物は、組成物の皮膚透過、皮膚塗布、組織吸収/吸着、皮膚感作、及び/または皮膚刺激を改善するような他の分子と組合または結合している。その分子は、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアンモニウムオキシド、オゾン、デシルメチルスルホキシド、ラウリルエトキシレート、エタノール及びそれらの混合物からなる群から選ばれるのが好ましい。

その化合物は、薬剤前駆体(prodrug)の形態であってもよい。プロドラッグ技術のさらなる情報は、「医薬品デザインと先端のテキストブック(A Text Book of Drug Design and Development)」、ボブル・クロッグスガード-ラーセンとハンス・ブンドガード(Poul Krogsgaard-Larsen and Hans Bundgaard)編、5章「プロドラッグのデザインと応用(Design and Application of Prodrugs)」、H.ブンドガードに見いだすことができる。この参考文献の開示は、ここでクロス・リファレンス(cross-reference)として含まれている。

上で述べたように、本発明の組成物は経口投与されるのが好ましい。当業者には理解されるように、その組成物を経口デリバリー(delivery)への適合性を改善するよう多くの努力をなすことができる。経口デリバリーのさらなる情報は、「ペプチドとタンパク質ドラッグデリバリー(Peptide and Protein Drug Delivery)」、ビンセントH. L. リー(Vincent H.L. Lee)編、16章「ペプチドとタンパク質ドラッグデリバリーの経口経路(Oral Route of Peptide and Protein Drug Delivery)」、V. H. L. リーらに見いだすことができる。この参考文献の開示は、ここでクロス・リファレンスとして含まれている。

リビニルビロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリエチレノキシド、カルボポール(carbopol)及びキサンタンガムのような合成高分子、そしてそれらのポリマーの混合物である。そのような組成物は、緩衝剤、保存剤、遮光剤、丸化分散剤のような補葉を含んでいてもよい。好ましい保存剤は、四級アンモニウム化合物、フェニル水酸塩、ベンゾイルアルコール、ファニルエタノールなどの抗酸剤、及びメタビスルフィドナトリウムのような酸化防止剤を含んでいる。好ましい緩衝剤は、ボレート、アセテート、グリコネート及びホスフェート緩衝剤を含んでいる。製薬的な点眼の組成物はソリッド・インサート(solid insert)の形態であってもよい。

これまでの議論で明らかのように、糖尿病の合併症及び病理は、非酵素的グリコシレーションを減少または防止することによって処理できる。従って、本発明の方法は、酵素的グリコシレーションによる他の疾患状態の、他の有害な合併症及び病理の処理に有効であることが予想できる。

本発明の性質がより明確に理解されるために、好ましい形態を、以下の実施例及び図面を参照して説明する。

第1図は、L-カルノシンと塩との反応速度を示す。L-カルノシン(60mM)は、pH 7の5.0 mMナトリウム-リニン酸塩緩衝液中で、5時間60°Cで、塩(180 mM)と反応させ、カルノシンの自由アミノ基の減少を、HPLCによって測定した。SEM(培養混合物中の全カルノシンの±1%)

第2図は、カルノシンのアテローム性動脈硬化症に対する影響を示す。(■コレステロール、□コレステロール+カルノシン)

第3図は、糖尿病ラットにおける白内障の形成に対するカルノシンの影響を示す。(■糖尿病、□糖尿病+カルノシン)。

発明の詳細な説明

方法

塩に対するペプチドとアミノ酸誘導体との反応

別の方法を除き、反応は、60°Cの水浴中、密封されたミクロ透心分離用バイアルの中、リン酸塩で緩衝化された塩浴液、PBS、(140 mlのNaCl/

特表平7-500580 (5)

LMW ブルーデキストラン	>2,000,000	15.65	n=5
アルブミン	67,000	33.74	n=6
オボアルブミン	43,000	35.57	n=5
キモトリプシンA	25,000	39.23	n=6
リボヌクレアーゼA	13,700 共溶出	39.23	n=6

固形化合物の吸収率と湿潤性の測定性の分析（エイムズ試験）

クリケートした化合物の準備が、キム (Kim) 5 (1991) にしたがって成される。簡単に言えば、D-グルコース (1M) と、次のそれぞれ：L-カルノシン、L-リジン、L-アラニン (全て 1M) とが蒸留水中に溶解され、pH が 7 に調整され、混合物が 100°C で 8 分間加熱される。温度 (50 μl と 2.5 μl) は、標準的なネズミ肝臓のミクロソーム (S-9) の準備による代謝活性を用い、または、用いずに、プレート導入方法 (Karon と Aes, 1983) を使用するネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA 100 株に対する評価を行う。2-AAF と 2-AAF とは、代謝測定を持つ試験のために、陽性コントロールとして使用され、さもなければ、ナトリウム アジ化物が、特別な陽性コントロールの機能として含まれる。

アテローム性動脈硬化のカルノシンの効果

高いコレステロール (2%) 飼料で飼育された雄のニュージーランドホワイトクロスラビットが、コントロール、またはカルノシン処理 2% のために無作為に使用され、そして、血漿がコレステロールとトリグリセリドとカルノシンとのために検査される。全ての動物は、一日当たり食料ペレット 100g の給餌とし、水は自由採取とした。

8 週間の処理期間の後、各ラビットは、ペントバルビタール (325 mg/kg) を用いて麻酔し、全ての大動脈を取り除く。首部、胸部、腹部の領域は最初の一対の肋骨の動脈と腹腔の動脈の上方 0.3 cm とに最も近い端部 1 cm の大動脈を切ることにより分離する。動脈血管外膜を注意深く切り裂き、動脈は、腹腔内膜の表面をさらすように段々に切断する。大動脈は、48 時間、10% のホルマリン固定剤の中で処理される。これらの容器の中の脂質ブラークがスーダン IV (Sudan IV) を用いて染色され、さらに水性媒体 (カイザーズグリセロールゼ

10 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.4) で行われる。反応混合物は、50 mM のペプチドと、500 mM の糖とを含む。指定条件の時間のポイント毎にサンプルが取られ、水で 1:20 に希釈され、HPLC による分析の時は -20°C で貯えられる。

アミノ基の検出

ペプチドの最終アミノ基の検出のためには、ウォータースオート、(Waters AUTO) OPAT™ が使用される (Waters AUTO, TAG™ 操作便覧)。簡単に言うと、ペプチドは、ローフタルアルdehyd と反応され、蛍光性の誘導体が、溶液として 15 分間にわたって 10% から 90% (容量/容量) のメタノールの勾配を用いたラジカル-PAK™ C18 カラム上の HPLC により分離される。励起 340 nm / 放射 440 nm のウォータース 470 蛍光検出セット (Waters 470 fluorescence detector set) が使用される。

グリケートした蛋白質 (Glycated Proteins) の HPLC 特性のゲルろ過クロマトグラフィー:

カラム スパロース 6 (Superose 6), ファーマシア (Pharmacia)

試料： 蛋白質の試料 (約 100 μg) の 100 μl

溶媒用： 1.0 mM のリン酸緩衝液 pH 7.38, 1.40 mM の NaCl, 2 mM の KCl, 0.02% の NaNO₃, 0.05% のツィーン (Tween) 20

流量 (FLOR RATE) : 0.5 ml/min

検出： 280 nm

校正はファーマシア (Pharmacia) の高分子量 (HMW) と低分子量 (LMW) との校正キットを用いて成される。

校正成分	分子量	保持時間	
HMW ブルーデキストラン	>2,000,000	15.49	n=5
チログロブリン	669,000	25.84	n=6
フェリチン	440,000	29.73	n=5
カタラーゼ	232,000	32.58	n=6
アルドراーゼ	158,000 共溶出	32.58	n=6

リー (Kaiser's Glycerol Jelly)) が費やされる。障害が起きた部分は、直接的に、組織分析 (アイコン (Eye com) 850 画像プロセッサー) を用い、該部部分を直接走査する。コンピューターを用いた面積測定は、影響を受けた領域のパーセンテージを肉眼的に決定するのに用いられる。アテローム性動脈硬化症のデーターの代表的な部分は、光学顕微鏡法による歴歴のために、取り除かれる。結果は、平均 ± SEM として表される。

糖尿病のネズミの中の白内障の形成

200-250 g の重さで、直後 6 週間の雌のスプレイグダウレイ (Sprague-Dawley) ネズミは、次の三つの治療グループ：コントロール、糖尿病、カルノシンで処理された糖尿病のネズミを無作為に使用した。糖尿病は、ストレプトゾトシン (streptozotocin) STZ (くえん強酸剤、pH 4.5 中、体の重量に対し 60 mg/kg) で引き起こさせ、一週間後、20 mM 以上の血糖のグルコースのレベルを持つ全ての動物が研究に含まれる。糖尿病のネズミは、治療されてないもの、または、飲料水中に 2% のカルノシンを受けたものが無作為化される。

結果

実験上

糖とカルノシンの反応

グリケーション (glycation) 中のアルdehyd とアミノ基との間の反応速度は、単に温度だけでなく、反応物の濃度にも依存し、このように、平衡の影響を受けない反応の速度を上げるために、生体外での実験中、非生理的な条件の使用が禁される。マイラード反応の中の最初のステップは、アルdehyd と二つのアミノ基の間のシップ塩基の形成であり、糖の直線状の鎖の形の量にしたがって変化する。これはアマドリ乾燥と複雑な二次反応による結果として起こり、多くは十分に理解されていない。

グルコース、ガラクトース、カルノシンを持つジヒドロキシアセトン (dihydrexacetone (DHA)) のインキュベーションは、マイラード (1912) により最初に述べられたように、グリケーションの特色として茶色の溶液を生ずる。糖とカルノシンの反応は、HPLC 後に、蛍光定量的に測定された遊離アミノ基の消失をもたらす。グルコース、ガラクトース、DHA は、それらとカルノシン

との反応において異なる (第 1 図)。グルコースは、反応性が少なく、DHA が多く、少なくとも 1.5 倍の差を示す。その簡便性のために我々は以後の追跡した多くの研究の中で、トリオース DHA の使用を選択した。

実験例 2

カルノシンによるウシ血清アルブミンの変成を誘発するジヒドロキシアセトンの選択

ウシ血清アルブミン (50 mM のリン酸ナトリウム緩衝剤、pH が 7.0 で、5.0 mg/ml) の生理学上の濃度は、4 週間のあいだ 2.3 で、2.50 mM の L-カルノシンの存在と不在とにおいて 2.50 mM のジヒドロキシアセトンを用い、または、これを用いないインキュベートされる。実験は無菌の状態下で行われ、イオン強度は全てのバイアル中で同一である。結果を、第 1 表に示す。

この長期間の実験において、ジヒドロキシアセトンは、グリケートしたアルブミンを有し、アマドリ乾燥の結果として、引き続いて、固体ゲルの形成を誘発する。カルノシンが存在するときはバイアルの中身は液体のままである。

第 1 表

インキュベーション条件	結果物の効果
アルブミン + リン酸緩衝剤	黒色、液体
アルブミン + ジヒドロキシアセトン	茶色、黒いゲル
アルブミン + ジヒドロキシアセトン	黒い茶色、液体
ウシ血清アルブミンの非酵素的なグリコシレーションのジヒドロキシアセトン誘発に関するカルノシンの効果。	

実験例 3

カルノシン及び異なるアミノ酸とグルコースとの反応速度の比較

蛋白質とグルコースによろは糖との様な非酵素的なグリコシレーションは、生理学的な値から 50 °C にまで温度を引き上げることにより、インピトロで促進される。インピボ及びインピトロのグルコースの主なターゲットは、塩基性のアミノ酸リジンとアルギニン (遊離か、蛋白質中の混合かのいずれか) である。第 2 表はカルノシン及び異なるアミノ酸とグルコースとの反応の比較を示す。還元糖のためのマイラード反応の特異性を示すために、グルコースは、ソルビトール

(非還元糖)により置換される。グルコースまたはソルビトール(50 mMのリシン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0の中、250 mg/ml)の500 μlは、18時間、50°Cで、異なるアミノ酸またはカルノシン(500 mM)を用いてインキュベートされる。その結果生じる溶液の400 nmの光密度が測定される(表2)。カルノシンは、最も早く反応するアミノ酸、L-リジン又はペーターアラニンの各々よりも、約2倍、または、8倍以上に、より多くのメイラーード反応生成物を形成する。少量のメイラーード反応の生成物は、カルノシンがソルビトールと反応したときに、多分還元糖へのソルビトールの自動酸化のために明白となる。

[以下省略]

表2表

グルコース又はソルビトールとジペプチド又はアミノ酸との間のメイラーード反応生成物の400 nmでの吸光度

インキュベーション条件	OD 400 nm
グルコース+PBS	0.175
グルコース+カルノシン	8.455
ソルビトール+PBS	0.000
ソルビトール+カルノシン	0.209
カルノシン+PBS	0.041
グルコース+D,L-アラニン	0.266
ソルビトール+D,L-アラニン	0.008
グルコース+ペーターアラニン	1.240
ソルビトール+ペーターアラニン	0.010
グルコース+L-アルギニン	0.469
ソルビトール+L-アルギニン	0.010
グルコース+L-リジン	1.170
ソルビトール+L-リジン	0.009
グルコース+イミダゾール	0.046
ソルビトール+イミダゾール	0.035

実験例4

カルノシン、関係するペプチド及びアミノ酸とジヒドロキシアセトンの反応

カルノシン、関係したペプチド及びアミノ酸に対するDHAの反応率を比較する(表3表)時に、カルノシンはリジンよりも速やかに反応し、ジペプチドがグリケーションのためのアミノ基の他のソースに対して競合できることを示唆している。しかしながら、この定量においてリジンはその反応に寄与する2つのアミノ基を有しているのに、タンパク質中ではイブシロンアミノ基のみが有効に使用される。イブシロンアミノ基の単独のグリケーション割合の比較は、アルファアミノ基を遮断する、N-アルファカルボベンゾキシルーリジン(エーリジン

)が用いられる。DHAがZ-リジンのカルノシンの等モル混合物に添加される時、そのジペプチドは高斯アミノ酸よりも速やかに、約10倍の反応をする(表3表)。相対的な反応性は、グルコースが多糖化の場として消費されるときに保持され、その実験は10日間を完全に要する(表示せず)。蛋白質内に合併されたリジン残基によく類似した分子であるAc-Lys-NH₂Meは、カルノシンと比較してDHAとより遅い反応を示した。ペプチドAc-Lys-His-NH₂Meは蛋白質中の優先のグリケーションサイトに類似し、カルノシン投與のような両種の作用を示した。ペプチドのペーターアラニルーグリシンはDHAと實質的に反応せず、確固たるグリケーションのためのペプチド中の2つの位置でヒスチジンのための要求物が授与される(Shilton and Walton, 1991)。D-カルノシン(ペーターアラニル-D-ヒスチジン)が自然出現アミオマーと同じくらい速く反応する間に、より高い相間体の、相同カルノシン(ガムマーアミノ-ブチリル-レーヒスチジン)はゆっくりと反応した。これは、カルノシンに小さな側面上の変更(メチレン基の付加)がその反応性を減じていることを示す。それはまた、各種の基によるリジンの変型が反応率に與して意味のある効果を有していることが明白となる。Ac-Lys-NH₂Me(高斯アミノとカルボキシル基)がより速やかに反応するに対し、Z-リジンは高斯アミノ酸よりもゆっくりと反応した。

それはまた、高斯イミダゾールとサクシニルヒスチジン(アルファアミノ基が遮断された)が、ジペプチドのアミノ基の消失の割合の増大によって示されるようなDHAとカルノシンの反応性を増進させることができた。これは、アマドリ乾燥の触媒として又はAGE-生成物に向う反応の平衡をそれによって変化させる中間の形態との反応のいずれか一方のイミダゾールであることの示唆と一致している(Shilton and Walton, 1991)。

[以下省略]

表3表

化合物 反応した%

A ペーターアラニル-His-OH	2.6
ペーターアラニル-D-His-OH	2.6
Ac-Lys-His-NH ₂	2.5
Ac-Lys-NH ₂ Me	2.1
H-Lys-OH	1.7
ガムマーアミノブチリル-His-OH	1.5
Z-His-OH	3
ペーターアラニル-Gly-OH	2

B ペーターアラニル-His-OH+サクシニル-His	3.3
ペーターアラニル-His-OH+ミダゾール	4.3

ペプチドのグリケーションとDHAによるアミノ酸類物

AとB: 化合物は50°Cで5時間のあいだPBS中でDHAと反応させ、遮断アミノ基の損失をHPLCによって定量した。データはDHAと反応したアミノ基のパーセントとして表現した(インキュベーション混合物中の全ペプチド又はアミノ酸のSEM ± 1%)。B単独: サクシニル-Hisとイミダゾールはペーターアラニル-His-OHと定義した後のアミノ基に等モル濃度で添加した。

実験例5

グリケート化アミノ酸とグリケート化カルノシンの変異原性の特性

リジンとアルギニンのようなグリケート化アミノ酸(glycated amino acids)は、Maron and Ames(1983)"エイムス試験"によって最初に開示された分析システ

ムにおいて変異原性のあること (Itoら, 1991) が報告されている。他のプロリシンとシスティンのようなグリケート化アミノ酸は変異原性が示されていない。我々はL-カルノシンの変異原性を調査し、またL-カルノシン、L-リジン及びL-アラニンからグリケート化している(第4表)。4つの化合物の全ては、特に250 μMで、何等かの活性度の抑制が表われた。我々のデータでは、グリケート化されたL-リジンが変異原性であり、それによって活性度があるであろうという。Itoら(1991)による前の結果と一致する。その活性は、ラット肝のS-9代謝活性化システムによってわずかに増加する。グリケート化されたL-アラニンは以前の報告では弱い変異原性であり、我々の実験においては変異原性でないことを示した。L-カルノシンとグリケート化されたカルノシンの両方には変異原性ではなかった。これは、インビボのメイラード反応において意味のある役割をカルノシンが担じてであろうことが予測されるであろう。L-カルノシンとL-リジンのグリケート化の形態の差異の理由は知られていない。

[以下余白]

第4表

化合物	投与 (μM)	TA 100によるプレート毎の復元率	
		S-9なし	S-9あり
L-カルノシン	250	158 ± 11	149 ± 13
	50	154 ± 14	179 ± 15
グリケート化された	250	142 ± 17	158 ± 19
L-カルノシン	50	159 ± 7	167 ± 10
グリケート化された	250	277 ± 21	244 ± 13
L-リジン	50	357 ± 17	553 ± 19
グリケート化された	250	145 ± 6	146 ± 9
L-アラニン	50	160 ± 9	181 ± 10

陰性コントロール	161 ± 6	188 ± 10
+アジド	>1000	N/A
+2AF	N/A	250 ± 33
+2AAF	N/A	500

グリケート化された化合物の変異原性ボテンシャル

サルモネラ タイフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) TA 100は、hisGからhisFへの突然変異系の宿主である。データはプレート毎の復元

細胞の平均値と、ラット肝のミクロソーム的な(S-9)調製物によって代謝性剤の有るものと無いもののそれらの試験溶液とコントロールのための標準偏差とを表現した。

実験例6

花巻乳酸グリコシレーヌによる回転としてのアミノグアニジンとカルノシンとの比較

ウシ血清アルブミン(BSA)とオボアルブミンのグリケーションに関するカルノシンとアミノグアニジンの両方の効果の比較は、DNAの一重量と、沈降ゲーターのいずれかについて濃度を変えたものを60°Cでインキュベートしてなされた。反応の出発時点と7時間経過後の一定部分を取り、反応物の展開はスパロース6(Sperose 6)カラムによるゲルろ過によって分析した。蛋白質の架橋化とフラグメント状態は、コントロールとして使用した未処理の蛋白質と比較した保持時間中の変化として目に見えて明確となる。幾つかの化合物は、最も小さな化合物のために理論上の保持時間の後に現われた。それらは高いイオン濃度と高濃度(ツイーン20)の存在で一様なカラム研磨で妨害される傾向がある。それらは小さな化合物の必要性ではなく、むしろ高い充填度と反応性である。第5表にそのデータを要約する。2つの化合物はこのシステムにおいて別々に反応するとと思われる:カルノシンは高分子量の化合物の形成が検じられ、アミノグアニジンに比べ低い濃度で実質的により多くの効果がある。反応生成物が持続付けられない全てのアミノグアニジン試料は高濃度で慢性的に形成される(低分子量の形態“LMW”として記載され、何故ならばその保持時間は他の全ての化合物での既測より長い)。アルブミンモノマーのピーク面積が検出されることから、これらはオボアルブミン、アミノグアニジンとDHAの間の反応生成物であろう。3つの化合物の全ては、保持時間又はピーク面積が7時間のあいた間隔の条件のもとで別々にインキュベートされる時に変化しないことが示された。LMWはまた、オボアルブミンがインキュベーション混合物中のウシ血清アルブミンによって取替えられる時に既測される(表記せず)。そのLMWはカルノシン試料中に少しも存在していない。

第5表

オボアルブミン	クロマトグラムの出現パーセント		
	HMW	モノマー	LMW
7時間後			
カルノシン試料			
[A] から [D]	0	100	0
[コントロール]	0	100	0
アミノグアニジン試料			
[A] から [D]	0	100	0
[コントロール]	0	100	0
7時間後			
カルノシン試料			
[A]	9	91	0
[B]	6	94	0
[C]	3	97	0
[D]	25	75	0
[コントロール]	68	32	0
アミノグアニジン試料			
[A]	0	31	69
[B]	8	20	72
[C]	0	41	49
[D]	38	40	22
[コントロール]	68	32	0

凡例：オボアルブミンは、カルノシン又はアミノグアニジンのいずれか一方が各溶液の濃度で存在する中で7時間のあいだDHAと一緒にインキュベートした。反応生成物はゲルろ過カラム（スパロース6）で分離し、ピークは保持時間に従って分離した：HMW、高分子量（15-30分）；アルブミンモノマー（35分）；及び直列に現れる化合物LMW、低分子量（>40分）。カルノシンとアミノグアニジン濃度は【コントロール】0 mM、【A】600 mM、【B】300 mM、【C】100 mM、【D】50 mM。

沈降ゲリケーターの有効性のために良い尺度は、反応の7時間後に残存する未反応のアルブミンの量である。この点でカルノシンはアミノグアニジンと比べ全ての濃度でより有効であった。

実験例7

アテローム硬化症におけるカルノシンの効果

冠状動脈心臓疾患は糖尿病及び同様に非糖尿病の最も多い死因の一つである。グリケーションはアテローム性plaques（atherosclerotic plaques）に加え、糖尿病性腎炎や目の疾患を含む多くの糖尿病合併症の進展を包含している。コレステロール始源ウサギは8週間の期間を超えてアテローム性plaquesに関するカルノシンの効果を試験に使用した。我々の研究では、カルノシンによりグリケーションの抑制がplaques形成を防ぐことができる事を示している。これらの場合第2回に示される。

そのデータのための2つのテールPはマン・ホワイトニー（Mann-Whitney）の2サンプル試験を用いて算出した：腹部大動脈 = 0.0529；腹部大動脈 = 0.5368；大動脈弓 = 0.6623。全てのデータはアミノグアニジン（n=11）給餌に対して糖尿病コントロール（n=12）。その他の動物は統計的により良い結果を与えるこの研究において使用した。しかしながら、これらは非酵素的グリコシル化の抑制の両方がplaques形成を減らすことを明確に示す。

その動物の体重は8週間の処理期間を越えて減少し、しかしながらコントロールとカルノシン処理群の間で差はなかった。

さるであろう。我々は streptozotocin を導入した糖尿病ラットモデルにおいてこれを試験している。カルノシン食餌動物について8週後には、糖尿病コントロール群（Mann-Whitney 2サンプル試験、2テール p値 = 0.2092；カルノシン給餌に付する糖尿病コントロール）に比べて高度な明瞭性（混濁なし）を示した（第3回参照）。これは5日で測定されて以来、実験の半端点で、その傾向がカルノシン給餌によって白内障の形成における減少として示される。

白内障は動物モデルにおける確實の減少のみでなく誘発させることができる。バビズハエブ（Babishayev, 1989）は過酸化した脂質が動物モデルにおいて過酸化する糖尿病の開始的原因の一つとし得ることを示している。リボソームの懸濁物の注入は後方角膜下白内障の進展を誘発する過酸化した脂質を含有するリン脂質から開始した。同様な白内障モデルによる他の発見は過酸化した脂質にに基づき、カルノシンと類似の抗酸化剤によって抑制し得る。メイラード反応生成物の形成は、しかしながら、経路には差せず、抗酸化剤によって影響を及ぼすことができない。

[以下省略]

コントロールに対するカルノシン効果において既測された各種器官の重量は差はなかった。

	体重 (g)	
	0週	8週
コントロール	3.27 ± 0.09	2.75 ± 0.17
カルノシン	3.33 ± 0.09	2.68 ± 0.12

	8週処理後の器官の重量 (g)		
	肝臓	腎臓	心臓
コントロール	135.94 ± 5.06	16.20 ± 0.67	7.92 ± 0.53
カルノシン	124.40 ± 6.36	17.53 ± 0.69	6.12 ± 0.27

実験例8

糖尿病ラットにおける白内障の形成に関するカルノシンの効果

白内障は十分な視力が損なわれる屈曲レンズの混濁化である。糖尿病は、白内障の原因の一つの形態が糖尿病であるということが多い年月と多くの糖尿病研究で支持されるという観点により糖尿病と関連付けられている。動物中の糖尿病はストレプトゾトシン（streptozotocin）によって誘発させることができ、レンズの混濁は注射20日後により選択的に発生するが、高い混濁は注射時の年齢によつて約100日後に出現した。

レンズの蛋白質を含んだ蛋白質への糖質の白内障内軸は、確認され、定量されている。最も多くの組織では糖尿病において一様な後期のメイラード生成物の少しの蓄積があるが、レンズは中の蛋白質は早期のグリケーション生成物の蓄積ばかりでなく、白色のメイラード生成物に変化するそれらの時間を有する。化学的実在物と酵素の構造変化説明の各種を生じる糖質の最初の攻撃は、蛋白質とレンズの結晶体とそれら各々の経路が損傷を生じ得る。糖質の反応性アルdehydesを補足可能なそのものとカルノシンに類似する化合物とは白内障の開始を減少

実験例9

糖尿病ラットにおける蛋白質、グリケート化したヘモグロビンと血中グルコースレベルに関するカルノシンの効果

8週で有意の変化のないことが次のパラメーターについて既測された。

	アルブミン尿	
通常	糖尿病	糖尿病 + カルノシン
2.4 x ÷ 1.3	2.51 x ÷ 1.07	2.51 x ÷ 1.48

	グリケート化したヘモグロビン (Hb A1c) パーセント	
通常	糖尿病	糖尿病 + カルノシン
1.5 ± 0.1	4.83 ± 0.23	4.49 ± 0.14

	血中グルコース (mM 値 + SEM)	
通常	糖尿病	糖尿病 + カルノシン
10.0 ± 1.5	29.84 ± 4.88	22.63 ± 3.00

蛋白質と同様ににおける変化は糖尿病条件の約30週後に唯一観察することができる。そのアミノグアニジン化合物、非酵素的グリコシレーションの防止のための有効な使用は、給餌30週後の一日の糖尿病モデルにおいてグリケート化したヘモグロビンの量が減少することはない。この研究は現在継続している。

明白に示されたような発明の精神又は範囲から逸脱することなく、神奇な実験者において示したような本発明により各種の変更及び／又は变形が形成されるであろうことは当業者において明らかとなるであろう。本発明の実験者は、それ故、開示としての全ての開示において考慮されるものであり、それに限定されるものではない。

[以下省略]

文献:

- Gulevitsch, W., とAmiradzibi, S. (1900) Ber. Dtsch. Chem. Ges. 33, 1902-1903
- Maillard, L.C. (1912) C.R. Acad. Sci. 154, 66-68
- Shilton, B.R., とWalton, D.J. (1991) J. Biol. Chem. 266, 5587-5592
- Hammes, H.P., Martin, S., Federlin, K., Brownlee (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88, 11555-11558
- Kim, S.B., Kim, I.S., Yean, D.M. と Park, Y.R. (1991) Nut. Res. 254, 65-59
- Haron, D.M. と Ames, B.N. (1983) Nut. Res. 113, 173-215
- Babizayev, M.A. (1989) Biochimica et Biophysica Acta 1004, 363-371
- [以下省略]

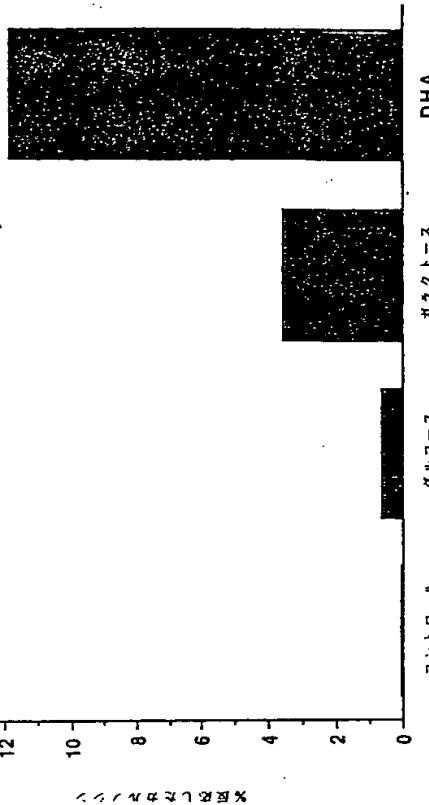


図1

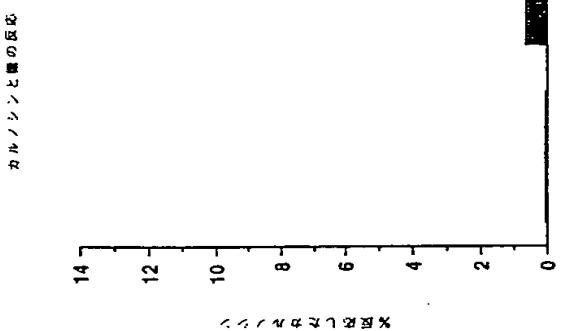


図2

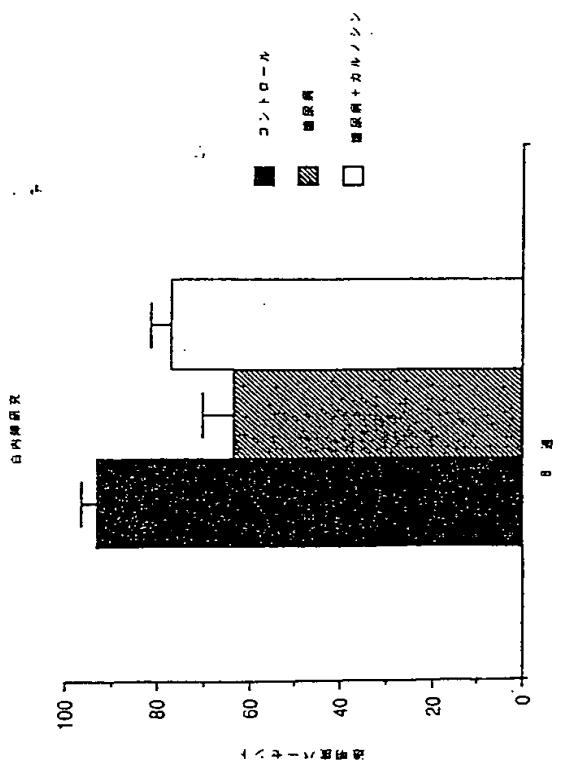


図3

アデローム活性化

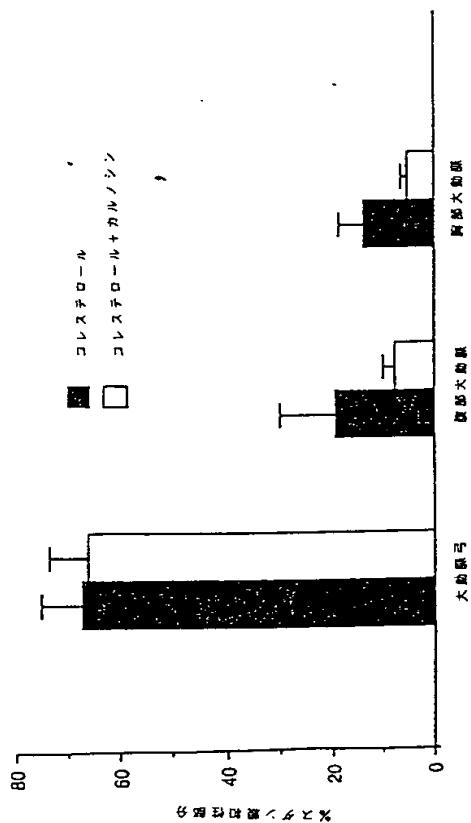


図4

国際調査報告

International application No.
PCT/AU92/00488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
In accordance to International Patent Classification (IPC) or its local national classifications and IPC Int'l Cl. A61K 37/02		
B. FIELDS SEARCHED		
Major document reported (classification system followed by classification symbols) IPC A61K 37/02		
Documentations reported other than main document in the notes that such documents are included in the fields searched AU: IPC as above		
Examinations have resulted during the international search (name of document, and where practicable, name of examiner) DERWENT: CHEM ABSTRACTS AND WPIAT DATABASES USING THE KEYWORDS: CAUNOSIDE, HOMO CARNOSEIDE, ANSERINE, HOMO ANSERINE, OPHRIDIOL, CARCINOGEN AND DIABETES		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referred to Class No.
X ✓	EP-A-313564 (ZERIA PHARMACEUTICAL CO., LTD. AND HAMARI CHEMICALS, LTD.), 3 May 1990 (03.05.90) page 3 lines 11-16, page 7 lines 2-4	12-15, 18-21
X ✓	EP-A-303180 (HAMARI TAKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 15 February 1990 (15.02.90) page 2 lines 41-49, and the claims	12-15, 18-21
X ✓	US-A-4717716 (KINESHTRO NAGAI AND TAIZO SUDA), 5 January 1982 (05.01.82) column 8 lines 39-65, column 9-10 lines 2-4, and the claims	12-15, 18-21
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of item C.	<input checked="" type="checkbox"/> See parent family report.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <ul style="list-style-type: none"> -A* Document defining the general state of the art which is not considered to be prior art for the claimed invention. -D* Document defining the general state of the art which is earlier than the claimed invention but published on or after the international filing date. -T* Document which may later decide on priority (earlier documents which may later decide on priority cannot be cited as prior art under Article 54(2)(a) of the PCT). Such documents may also be cited if they relate to the problem which the claimed invention aims to solve (for example, a document relating to a similar problem or a document which discloses a method or procedure which is used in the claimed invention or which is used in a method or procedure disclosed in the claimed invention). -G* Document relating to an oral communication, oral communication published prior to the international filing date but later than the priority date claimed. -P* Document published after the international filing date but before the priority date claimed. <p>-P* Document number of the same parent family.</p>		
Date of the initial completion of the international search 15 December 1992 (15.12.92)	Date of mailing of the international search report <i>24 DEC. 1992 (24.12.92)</i>	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 2000 WOOLSTON ACT 2606 AUSTRALIA Postcode No. 261329729	Authorized officer <i>TAMARA NIENKE</i> Telephone No. (06) 2322349	

Form PCT/ISA/210 (continuation of search sheet) (July 1992) COPIUM

国際調査報告

International application No.
PCT/AU92/00488

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Referred to Class No.
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referred to Class No.
X	US-A-4508728 (KINESHTRO NAGAI AND KINUKO NAGAI), 2 April 1993 (02.04.93) column 3 lines 20-68, column 6, columns 7-11	12-15, 18-21
X	WO-A-9006102 (PEPTIDE TECHNOLOGY LIMITED), 14 June 1990 (14.06.90) page 3 lines 11-21	12-15, 18-21

Form PCT/ISA/210 (continuation of search sheet) (July 1992) COPIUM

国際調査報告

International application No.
PCT/AU92/00488

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the parent document cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Parent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
WO	9006102	AU	43320789	EP	436611		
EP	313564	JP	62014728	US	4927817	WO	9300048
US	4717716	CH	666118	DE	3540632	DK	5005985
		FR	2577118	GB	2170707	JP	61194322
		NL	8600112	SE	1505121		
EP	303180	JP	1042471	US	4981844		
US	4508728						

END OF ANNEX

Form PCT/ISA/210 (parent family sheet) (July 1992) COPIUM

フロントページの続き

(72)発明者 ヒブキッス, アラン ロジャー
イギリス国 SE12 0UF ロンドン
リー ゲイブルス クローズ 83

(72)発明者 バナジオトパウロス, シアンナ
オーストラリア国 3108 ヴィクトリア
ドンキャスター ライアル コート 2